

# Antibakterijski učinak preparata „Sanosil super25” na višestruko rezistentne bakterije *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*

## Antibacterial effect of „Sanosil super25” on multiple resistant bacteria *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*

Ana Kovačić<sup>1</sup>, Jasna Hrenović<sup>2</sup>, Ivana Goić-Barišić<sup>3</sup>, Miroslav Barišić<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split

<sup>2</sup> Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb

<sup>3</sup> Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Klinički bolnički Centar Split, Split

<sup>4</sup> Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije, Ordinacija dentalne medicine Stari Grad, otok Hvar

### Ključne riječi:

*Acinetobacter baumannii*  
*Klebsiella pneumoniae*  
dezinfekcija  
Sanosil super25

### Keywords:

*Acinetobacter baumannii*  
*Klebsiella pneumoniae*  
disinfection  
Sanosil super25

Primljeno: 05-05-2020

Received: 05-05-2020

Prihvaćeno: 07-06-2020

Accepted: 07-06-2020

### ✉ Dopisni autor:

Doc. dr.sc. Ana Kovačić, dipl.ing.biolog.  
Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske  
županije, Vukovarska 46, 21000 Split  
E-mail: ana.kovacic@nzjz-split.hr

### Sažetak

Višestruko rezistentne bakterije, uzročnici hospitalnih infekcija, kao što su *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*, predstavljaju globalni problem 21. stoljeća. Osobito zabrinjava sve učestalija pojava otpornosti ovih mikroorganizama na komercijalno dostupne dezinficijense. Cilj našeg istraživanja bio je utvrditi učinkovitost dezinfekcije proizvoda „Sanosil super25”, u odnosu na vodikov peroksid i to na višestruko rezistentne izolate *A. baumannii* i *K. pneumoniae*. Ispitane su vrijednosti MTC (maksimalno tolerirajuća koncentracija); MIC (minimalna inhibirajuća koncentracija) i MBC (minimalna baktericidna koncentracija). MTC Sanosila (<1.25 ppm) bila je dvostruko manja u odnosu na vodikov peroksid. MIC-e Sanosila (1.25 ili <1.25 ppm) su bile 4 puta manje u odnosu na vodikov peroksid. MBC koja rezultira izostankom vijabilnih bakterija za Sanosil je bila <1.25 ppm već nakon 5 min kontakta, što je barem 8 puta niža koncentracija u odnosu na vodikov peroksid. Rezultati su pokazali da je Sanosil super25 bio učinkovitiji u sve tri kategorije, u odnosu na vodikov peroksid.

### Abstract

Multi-resistant bacteria, the causes of nosocomial infections, such as *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, represent a global problem of the 21st century. The increasing resistance of these microorganisms to commercially available disinfectants is of a particular concern. The aim of our study was to determine disinfection effectiveness of the product „Sanosil super25”, in relation to hydrogen peroxide, to multiple resistant isolates of *A. baumannii* and *K. pneumoniae*. The tested parameters were: MTC values (maximum tolerated concentration); MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration). The MTC of Sanosil (<1.25 ppm) was twice as low as that of hydrogen peroxide. Sanosil MICs (1.25 or <1.25 ppm) were 4-fold lower than hydrogen peroxide. The MBC resulting in the absence of viable bacteria for Sanosil was <1.25 ppm after only 5 minutes of contact, which is at least 8 times lower concentration than hydrogen peroxide. The results showed that Sanosil super25 was more effective in all three categories, compared to hydrogen peroxide.

### Uvod

Pojava višestruko rezistentnih bakterija, kao uzročnika hospitalnih infekcija, postala je globalni svjetski problem 21. stoljeća i znanstvenici ulažu iznimne napore kako bi pronašli učinkoviti način njihovog uklanjanja. Među takvim „ESKAPE” bakterijama, koje su dijelom „izmakle” djelovanju antibiotika, vodeće mjesto zauzimaju *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*<sup>[1,2,3]</sup>. Osobito je značajan razvoj rezistencije ovih bakterija na karbapeneme koji se smatraju zadnjom linijom obrane u liječenju oboljelih<sup>[3]</sup>. Rezistencija na karbapeneme kliničkih izolata *A. baumannii*

u Hrvatskoj iznosila je više od 90% u 2018. godini, a smrtnost od ovog uzročnika u jedinicama intenzivnog liječenja može biti i preko 75%<sup>[2,3]</sup>. Sojevi bakterija, koji su otporni na djelovanje antibiotika, selektiraju se u bolničkoj sredini i smatra se da su takva mjesta ishodišta epidemija. Međutim, ostaje nejasno postoji li možda stanište takvih mikroorganizama i u okolišu<sup>[2]</sup>. Ovo pitanje postaje sve značajnije zadnjih godina jer su višestruko rezistentni izolati *A. baumannii* i *K. pneumoniae* pronađeni u okolišu, gdje mogu preživjeti i kroz nekoliko mjeseci. Sojevi *A. baumannii*, genetski vrlo srodni kliničkim izolatima, pronađeni su u rijeci

Savi, otpadnoj vodi Kliničkog bolničkog centra Split, kao i otpadnoj vodi grada Zagreba<sup>[3-7]</sup>. U Hrvatskoj je, u okolišu, nedavno po prvi puta pronađen i soj *K. pneumoniae* rezistentan na karbapeneme, i to u vodotoku rijeke Krapine. Istraživanje je pokazalo da je ovaj izolat bio sposoban preživjeti 50 dana u autoklaviranoj vodi rijeke<sup>[6]</sup>. Istraživanje, koje su proveli Štimac i sur.<sup>[8]</sup> koristeći *K. pneumoniae* Caroli pokazalo je kako ovaj soj u destiliranoj vodi, vodi iz slavine i morskoj vodi, može preživjeti i do 6 mjeseci.

Učinkovita dezinfekcija i uklanjanje mikroorganizama otpornih na antibiotike iz bolničke sredine nužna je kako bi se uspostavio nadzor nad bolničkim infekcijama i spriječilo širenje rezistencije na ostale mikroorganizme. Ono što zabrinjava je sve veća otpornost *A. baumannii* na komercijalno dostupne dezinficijense, kao što su benzalkonijev klorid i klorheksidin, ali i na one koji su na bazi fenola i glukonata, osobito ako se ne koriste u preporučenoj koncentraciji<sup>[2,9]</sup>. Primjena pare vodikova peroksida, uz ostale mjere kontrole bolničkih infekcija, pokazala je dobre rezultate u suzbijanju epidemije<sup>[10]</sup>. Otpornost na djelovanje dezinficijensa može se dovesti u vezu sa sposobnošću stvaranja biofilma<sup>[2,11]</sup>. Multicentrično istraživanje, provedeno u Hrvatskoj 2015. g., pokazalo je kako je čak 70% kliničkih izolata *A. baumannii* imalo sposobnost stvaranja biofilma<sup>[12]</sup>. U istraživanju koje su proveli Ivanković i dr.<sup>[9]</sup> dokazano je da su izolati *A. baumannii*, koji su stvorili biofilm na keramičkim pločicama, bili znatno otporniji na dezinficijense od onih koji su stvorili biofilm na staklu. Ovo istraživanje upućuje na to kako su upravo keramičke pločice u zdravstvenim ustanovama moguće stanište višestruko rezistentnih bakterija. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinkovitost primjene komercijalno dostupnog sredstva za dezinfekciju „Sanosil super25” na višestruko rezistentne izolate *A. baumannii* i *K. pneumoniae*.

## Materijal i metode

### Dezinficijensi

Za usporedbu antibakterijske aktivnosti Sanosil super25 (Sanosil AG, Švicarska) korišten je 30%-tni vodikov peroksid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Njemačka). Sanosil super25 (u tekstu dalje Sanosil) je višekomponentno sredstvo za dezinfekciju koje sadrži 50% vodikovog peroksida i 0.05% srebra (www.sensamed.hr).

### Bakterijski izolati

U pokusima su korišteni okolišni izolati bakterija *A. baumannii* (izolat Sava4)<sup>[5]</sup> i *K. pneumoniae* (izolat 9/1)<sup>[6]</sup>. Izolat *A. baumannii* je pronađen u vodi rijeke Save i otporan je na niz antibiotika, kao što su karba-

penemi, fluorokinoloni, aminoglikozidi i penicilini/inhibitori β-laktamaze. Metodom MLST (engl. multi-locus sequence typing) otkriven je njegov visok stupanj srodnosti s kliničkim izolatima *A. baumannii*. Izolat *K. pneumoniae* izdvojen je iz vode rijeke Krapine i prvi je KPC (*K. pneumoniae carbapenemase*) izolat pronađen u okolišu u Hrvatskoj. Otporan je na ampicilin, amoksicilin/klavulansku kiselinu, piperacilin/tazobaktam, sve cefalosporine, sve karbapeneme, trimetoprim-sulfametoksazol, ciprofloksacin, gentamicin i amikacin. I kod ovog je izolata utvrđen visoki stupanj srodnosti s kliničkim izolatima, metodom gel elektroforeze u pulsirajućem električnom polju (engl. pulsed field gel electrophoresis – PFGE).

### Postava pokusa

Izolati *A. baumannii* i *K. pneumoniae* umnoženi su odvojeno na neselektivnoj hranjivoj podlozi Nutrient agar (Biolife, Italija) pri 41°C tijekom 24h. Biomasa svake bakterije suspendirana je u 100mL autoklavirane komercijalno dostupne prirodne izvorske vode kako bi se dobila početna koncentracija oko 10<sup>7</sup> kolonija (engl. CFU – colony forming units) po jednom mL otopine. Početna koncentracija bakterija u suspenziji određena je nakon pripreve serije decimalnih razrjeđenja uzorka, nasađivanja na hranjivi agar, inkubacije (41°C/24h) te prebrojavanja kolonija.

Suspenzija svake bakterije raspoređena je u niz sterilnih epruveta od 10mL, u kojima je načinjena serija dvostrukih razrjeđenja ispitivanog dezinficijensa (koncentracije od 20 do 1.25 ppm). U epruvetu koja je korištena kao pozitivna kontrola nije dodan dezinficijens. Epruvete su ostavljene na sobnoj temperaturi od 22°C tijekom 120 min pokusa. Inkubacija na 22°C odabrana je s namjerom da se ispituju rezultati dezinfekcije vode u realnim uvjetima.

Nakon određenog vremena kontakta, iz svake je epruvete uzeto 10μL uzorka, koji je inokuliran u obliku kapljice na Nutrient agar. Inokulirane su ploče inkubirane na 41°C tijekom 24h<sup>[9]</sup>, nakon čega je očitana antibakterijska aktivnost dezinficijensa kako slijedi. MTC (engl. maximum tolerable concentration) je najveća koncentracija dezinficijensa koja ne utječe na rast bakterija u odnosu na pozitivnu kontrolu (bakterijska suspenzija bez dodatka dezinficijensa). MIC (engl. minimum inhibitory concentration) je najmanja koncentracija dezinficijensa koja uzrokuje vidljivu inhibiciju bakterijskog rasta u odnosu na pozitivnu kontrolu. MBC (engl. minimum bactericidal concentration) je najmanja koncentracija dezinficijensa koja uzrokuje izostanak bakterijskog rasta.

## Rezultati

Rezultati istraživanja prikazani su u Tablicama 1 i 2.

TABLICA 1. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE SANOSIL SUPER25 I VODIKOVOG PEROKSIDA NA *A. BAUMANNII* (IZOLAT SAVA4). VRIJEDNOSTI SU IZRAŽENE U PPM. KONCENTRACIJA *A. BAUMANNII* LOGCFU / mL = 7.4±0.1.

TABLE 1. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SANOSIL SUPER25 AND HYDROGEN PEROXIDE ON *A. BAUMANNII* (SAVA4 ISOLATE). VALUES ARE EXPRESSED IN PPM. CONCENTRATION OF *A. BAUMANNII* LOGCFU / mL = 7.4±0.1.

Vrijeme kontakta / Contact time (min)	Sanosil super25			vodikov peroksid		
	MTC	MIC	MBC	MTC	MIC	MBC
1	<1.25	1.25	2.5	2.5	5	10
5	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
15	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
30	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
60	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
120	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10

TABLICA 2. ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE SANOSIL SUPER25 I VODIKOVOG PEROKSIDA NA *K. PNEUMONIAE* (IZOLAT 9/1). VRIJEDNOSTI SU IZRAŽENE U PPM. KONCENTRACIJA *K. PNEUMONIAE* LOGCFU / mL = 7.0±0.1.

TABLE 2. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SANOSIL SUPER25 AND HYDROGEN PEROXIDE ON *K. PNEUMONIAE* (ISOLATE 9/1). VALUES ARE EXPRESSED IN PPM. CONCENTRATION OF *K. PNEUMONIAE* LOGCFU / mL = 7.0±0.1.

Vrijeme kontakta / Contact time (min)	Sanosil super25			vodikov peroksid		
	MTC	MIC	MBC	MTC	MIC	MBC
1	<1.25	1.25	5	2.5	5	10
5	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
15	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
30	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
60	<1.25	<1.25	<1.25	2.5	5	10
120	<1.25	<1.25	<1.25	1.25	2	5

## Rasprava

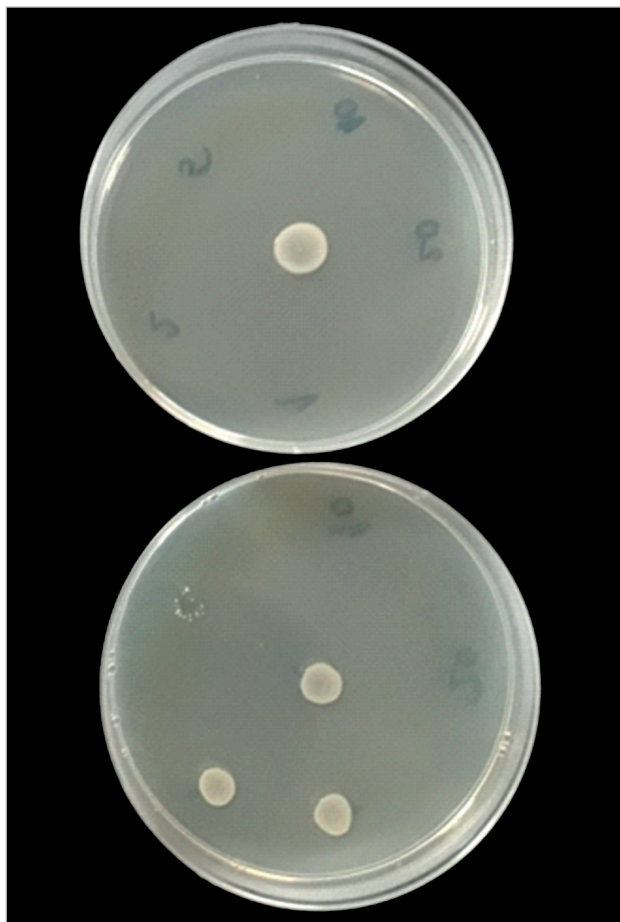
U ovom je istraživanju ispitan dezinfekcijski učinak preparata Sanosil na čiste kulture rezistentnih bakterija *A. baumannii* i *K. pneumoniae*. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da je preparat Sanosil bio učinkovitiji u inhibiciji rasta ispitivanih mikroorganizama, u odnosu na sam vodikov peroksid. MTC Sanosila (<1.25 ppm) je bila dvostruko manja u odnosu na vodikov peroksid. MIC-e Sanosila (1.25 ili <1.25 ppm) bile su 4 puta manje u odnosu na vodikov peroksid. MBC koja rezultira izostankom vijabilnih bakterija za Sanosil je bila <1.25 ppm već nakon 5 min kontakta (Slika 1. i 2.), što je barem 8 puta niža koncentracija u odnosu na vodikov peroksid. Naime, Sanosil super25 djeluje na principu sinergijskog djelovanja vodikovog peroksida i srebra. Vodikov peroksid djeluje oksidativno na lipide, proteine i DNA te staničnu stijenku mikroorganizama, tako da uzrokuje njihovu denaturaci-

ju. Taj je učinak pojačan djelovanjem pozitivnih iona srebra koji tvore veze s negativno nabijenim dijelovima stanične stijenke, pri čemu mijenjaju njenu poroznost. Ioni srebra, također, stvaraju disulfidne mostove s aminokiselinama koje sadrže sumpor, pri čemu dolazi do gubitka aktivnosti enzima<sup>[13]</sup>.

Uobičajeni način dezinfekcije vode za piće kao i vode za kupanje i rekreaciju je pomoću natrijevog hipoklorita. Preparati na bazi klora koji se koriste u dezinfekciji vode mogu djelovati korozivno. Jednako tako, postoji opasnost od stvaranja spojeva štetnih za ljudsko zdravlje, ako je takva voda opterećena organskim tvarima<sup>[14]</sup>. U vodoopskrbnim sustavima, gdje postoji opasnost od legionarske bolesti, uz hiperklorinaciju postupak dezinfekcije podrazumijeva zagrijavanje vode do temperature pasterizacije, ali je on često neučinkovit, upravo zbog stvorenog biofilma<sup>[15]</sup>. Jednako

SLIKA 1. ODREĐIVANJE MTC, MIC I MBC *ACINETOBACTER BAUMANNII* NAKON 5 MIN KONTAKTA SA SANOSIL SUPER25 (GORE) I VODIKOVIM PEROKSIDOM (DOLJE).

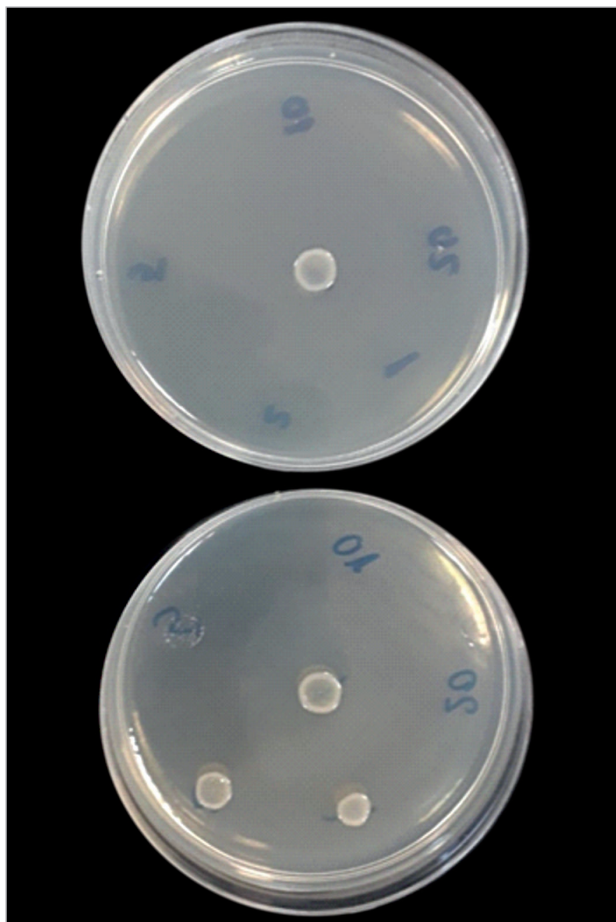
FIGURE 1. DETERMINATION OF MTC, MIC AND MBC OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* AFTER 5 MINUTES OF CONTACT WITH SANOSIL SUPER25 (ABOVE) AND HYDROGEN PEROXIDE (BELOW).



tako, bilježi se sve veći razvoj otpornosti mikroorganizama na uobičajena dezinfekcijska sredstva. Upravo iz ovih razloga, intenzivno se radi na ispitivanju novih preparata koji bi bili učinkoviti u uklanjanju mikroorganizama, a istovremeno neškodljivi za ljude, opremu i okoliš. Jedan od takvih proizvoda je i ovaj na bazi vodikovog peroksida i srebra. Različita su istraživanja pokazala kako upravo ova kombinacija vodikovog peroksida i srebra zadovoljava tražena svojstva – učinkovite dezinfekcije i sigurnosti u medicini i stomatologiji<sup>[16-19]</sup>. Problem u svakodnevnoj stomatološkoj praksi predstavlja onečišćenje jedinice zubarskog vodenog sustava. Sanosil super25 je u našem istraživanju pokazao odlične rezultate na rezistentne bakterije u čistoj kulturi, ali bilo bi vrijedno istražiti učinkovitost ovog preparata na mikroorganizme unutar biofilma, kao i na većem broju klinički značajnih mikroorganizama. Također, osim ovdje ispitane djelotvornosti u prirod-

SLIKA 2. ODREĐIVANJE MTC, MIC I MBC *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* NAKON 5 MIN KONTAKTA SA SANOSIL SUPER25 (GORE) I VODIKOVIM PEROKSIDOM (DOLJE).

FIGURE 2. DETERMINATION OF MTC, MIC AND MBC OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AFTER 5 MINUTES OF CONTACT WITH SANOSIL SUPER25 (ABOVE) AND HYDROGEN PEROXIDE (BELOW).



noj izvorskoj vodi, bilo bi korisno ispitati učinkovitost Sanosila i na uzorcima vode s različitim koncentracijom organskog opterećenja koje se može očekivati u bazenskim vodama.

### Zahvala

Ovo je istraživanje provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Prirodno stanište klinički značajnih *Acinetobacter baumannii*” (br. IP-2014-09-5656).

### LITERATURA

- [1] Goić Barišić I, Hrenović J, Kovačić A, Šeruga Musić M. Emergence of oxacillinases in environmental carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with clinical isolates. *Microb Drug Resist* 2016; 22(7): 559-563.
- [2] Goić Barišić I. Epidemiologija i rezistencija kliničkih izolata *A.baumannii* u Hrvatskoj tijekom desetogodišnjeg razdoblja – što se promijenilo? *Medicina fluminensis* 2018; 3(54): 268-273.



- [3] Dekić S, Hrenović J. Preživljavanje bakterije *Acinetobacter baumannii* u različitim tipovima vode. Hrvatske vode 2018; 26(103): 35-38.
- [4] Hrenović J, Durn G, Musić MS, Dekić S, Troskot-Čorbić T, Škorić D. Extensively and multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from technosol at a dump site in Croatia. Sci Total Environ 2017; 607-608: 1049-1055.
- [5] Šeruga Musić M, Hrenović J, Goić-Barišić I, Hunjak B, Škorić D, Ivanković T. Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. J Hosp Infect 2017; 96: 323-327.
- [6] Jelić M, Hrenović J, Dekić S, Goić-Barišić I, Tambić Andrašević A. First evidence of KPC-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water. J Hosp Infect 2019; 103: 147-150.
- [7] Kovačić A, Šeruga Musić M, Dekić S, et al. Transmission and survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outside hospital setting. Int J Microbiol 2017; 20: 165-169.
- [8] Štimac I, Marchesi V, Tomljenović M, Rukavina T. Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima voda. Hrvatske vode 2009; 71: 13-18.
- [9] Ivanković T, Goić-Barišić I, Hrenović J. Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. Arh Hig Rada Toksikol 2017; 68: 99-108.
- [10] Chmielarczyk A, Higgins PA, Wojkowska-Mach J, et al. Control of an outbreak of *Acinetobacter baumannii* infections using vaporized hydrogen peroxide. J Hosp Infect 2012; 81: 239-245.
- [11] Towner KJ. Global epidemiology of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2007; 13: S47-242.
- [12] Kaliterna V, Kaliterna M, Hrenović J, Barišić Z, Tonkić M, Goić Barišić I. *Acinetobacter baumannii* in Southern Croatia: clonal lineages, biofilm formation and resistance patterns. J Infect Dis 2015; 47: 902-907.
- [13] Tasić S. Efficiency evaluation of the disinfectant based on silver and hydrogen peroxide. J Agric Sci 2009; 54(3): 269-275.
- [14] Čalić R, Mihovec-Grdić M. Brominated trihalomethanes in drinking water. VI. scientific-professional conference „Water and public water supply”, Lovrić, Edo (ed). Mlini, Zagreb: Croatian Institute for Public Health and County Public Institutes, 2002. p. 87-91
- [15] Farhat M, Moletta-Denat M, Frère J, Onillon S, Trouilhé MC, Robine E. Effects of disinfection on *Legionella spp.*, eukarya, and biofilms in a hot water system. Appl Environ Microbiol 2012; 78: 6850-8.
- [16] Girolamini L, Dormi A, Pellati T, et al. Advances in Legionella control by a new formulation of hydrogen peroxide and silver salts in a hospital hot water network. Pathogens 2019; 8: 209.
- [17] Martin NL, Bass P, Liss SN. Antibacterial Properties and Mechanism of Activity of a Novel Silver-Stabilized Hydrogen Peroxide. PLOS ONE 2015; 10(7): e0131345.
- [18] Pedahzur R, Katzenelson D, Barnea N, et al. The efficacy of long-lasting residual drinking water disinfectants based on hydrogen peroxide and silver. Water Sci Technol 2000; 42(1-2): 293-298.
- [19] Davoudi M, Ehrampoush MH, Vakili T, Absalan A, Ebrahimi A. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and silver composition on selected pathogenic enterobacteriaceae. Int J Env Health Eng 2012;1:23.